

op111

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JG973 U.S. PRO
09/771043
01/26/01


別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2000年 1月26日

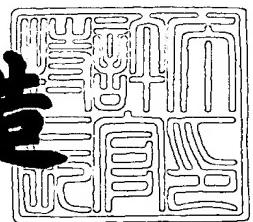
出願番号
Application Number: 特願2000-021843

出願人
Applicant(s): 日清紡績株式会社

2000年10月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3086442

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-7095
【提出日】 平成12年 1月26日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
【発明の名称】 固相化核酸及び核酸の検出法
【請求項の数】 6
【発明者】
【住所又は居所】 東京都足立区西新井栄町1-18-1 日清紡績株式会社
東京研究センター内
【氏名】 木村 直紀
【特許出願人】
【識別番号】 000004374
【氏名又は名称】 日清紡績株式会社
【代理人】
【識別番号】 100089244
【弁理士】
【氏名又は名称】 遠山 勉
【選任した代理人】
【識別番号】 100090516
【弁理士】
【氏名又は名称】 松倉 秀実
【選任した代理人】
【識別番号】 100100549
【弁理士】
【氏名又は名称】 川口 嘉之
【連絡先】 03-3669-6571
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 012092

特2000-021843

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固相化核酸及び核酸の検出法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 固相化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固相化される核酸であって、3'又は5'末端の一方に、3塩基又はそれ以上の長さのホモポリマーが結合した核酸。

【請求項2】 前記ホモポリマーが100塩基以下である請求項1記載の核酸。

【請求項3】 核酸はDNA又はRNAであり、DNAにあってはホモポリマーを形成する核酸塩基はアデニン、グアニン、シトシン又はチミンであり、RNAにあってはホモポリマーを形成する核酸塩基はアデニン、グアニン、シトシン又はウラシルである請求項1記載の核酸。

【請求項4】 前記ホモポリマー中に、同ホモポリマーを構成する核酸塩基と異なる塩基が挿入されていることを特徴とする請求項1記載の核酸。

【請求項5】 核酸固相化用基材と、この基材上に固相化された請求項1記載の核酸とを有する核酸固相化基材。

【請求項6】 固相化核酸を用いたハイブリダイゼーションによる核酸の検出法において、請求項5記載の核酸固相化基材を用いることを特徴とする核酸の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出に関し、詳しくは、検出感度が向上したハイブリダイゼーションによる核酸の検出法、並びに同方法に用いる核酸及び核酸固相化基材に関する。

【0002】

【従来の技術】

臨床検査、食品検査、法医学検査等の分野において、検体中に存在する核酸、抗体、抗原等生物学的に活性な物質を検出、同定する方法として、目的物質に応

じて核酸プローブ法、酵素免疫測定法等が用いられている。

【0003】

核酸を検出する方法としては、病原微生物等の菌種同定、法医学におけるDNA鑑定等があり、通常、標的となる核酸と相補的な配列を有する核酸を用いて、このものを酵素等で直接、またはハプテン等を介して間接的に標識する。この標識核酸と標的となる核酸をハイブリダイズさせる。ハイブリダイズしなかった標的核酸を除くかまたはその標識部分を不活性化した後に、ハイブリダイズした標的核酸の標識部分を検出することにより、標的核酸の存在及び量を確認できる。

【0004】

従来の核酸検出法においては、チューブ、マイクロタイタープレート、メンブレンフィルター、ビーズ等の固相表面に核酸を固定化することが非常に重要である。そのため、生物的活性物質核酸を固定化する種々の方法が公表されている。

【0005】

例えば、

①5'末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定 (P. J. R. Day, P. S. Flora, J. E. Fox, M. R. Walker, *Biochem. J.*, 278, 735-740(1991)) 等のような、修飾基を導入した核酸を基材に化学結合させる方法、

②核酸を、UV照射あるいは加熱処理によりニトロセルロース、ポリ-L-リジンまたはナイロンメンブレン等上に吸着固定 (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, page 2.109-2.113 and page 9.34-9.46、特表平10-503841号) したり、マイクロプレート上に物理吸着させ固定 (G. C. N. Parry and A. D. B. Malcolm, *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 230-231(1989)) する等のように、物理吸着で固定する方法、

③基材上に結合させたヌクレオチドを用い、基材上でDNAを合成する方法 (WO97/10365)、

等が知られている。

【0006】

しかしながら、①の方法においては、極めて特殊な機械と試薬を必要とし、また、②の方法においては、ハイブリダイゼーションを行った場合、特に操作過程で基板から核酸が剥がれ落ち、結果として検出感度が下がったり、再現性が得られない等の欠点があった。さらに、この方法では、長い核酸は固定化できるが、オリゴマー等の約50mer以下の中の短い核酸になると効率良く固定化できないという欠点があった。

【0007】

また、③の方法においては、基材上でDNAを合成するために極めて特殊な機械と試薬が必要とし、さらに、合成できる核酸も25mer程度までに限られるという欠点があった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、基材上に核酸を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、及び同方法を用いてハイブリダイゼーションによる核酸の検出を高感度で行う方法、及びこの方法に用いる核酸及び核酸固定化基材を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため検討を行った結果、核酸の3'又は5'末端に3塩基又はそれ以上の長さのホモポリマーが結合した核酸が、短くても強固に固定化できること、さらにこのようにして核酸を基材に固定化したもの用いると、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出感度を向上できることを見出し、本発明の完成に至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0010】

(1) 固相化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固相化される核酸であって、3'又は5'末端の一方に、3塩基又はそれ以上の長さのホモポリマーが結合した核酸。

(2) 前記ホモポリマーが100塩基以下である(1)記載の核酸。

(3) 核酸はDNA又はRNAであり、DNAにあってはホモポリマーを形成す

る核酸塩基はアデニン、グアニン、シトシン又はチミンであり、RNAにあってはホモポリマーを形成する核酸塩基はアデニン、グアニン、シトシン又はウラシルである（1）記載の核酸。

（4）前記ホモポリマー中に、同ホモポリマーを構成する核酸塩基と異なる塩基が挿入されていることを特徴とする（1）記載の核酸。

（5）核酸固相化用基材と、この基材上に固相化された（1）記載の核酸とを有する核酸固相化基材。

（6）固相化核酸を用いたハイブリダイゼーションによる核酸の検出法において、前記（5）記載の核酸固相化基材を用いることを特徴とする核酸の検出法。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

【0012】

<1>核酸

本発明の核酸は、3'又は5'末端の一方に、3塩基又はそれ以上の長さのホモポリマーが結合した核酸である。すなわち、本発明の核酸は、ホモポリマーパー部分と、ハイブリダイゼーションに関与する領域（以下、便宜上「特異的領域」ともいう。）からなる。本発明の核酸の特異的領域は、3'又は5'末端の一方にホモポリマーが結合していること以外は、通常の固相化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固相化核酸と特に変わることろはなく、ハイブリダイゼーションが可能な核酸であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成のDNA（オリゴヌクレオチドを含む）もしくはRNA（オリゴヌクレオチドを含む）が挙げられる。また、上記核酸は1本鎖であっても、2本鎖であっても構わない。また、特異的領域の長さは、ハイブリダイゼーションが可能な長さであれば特に制限されないが、通常5～10000塩基、好ましくは10～500塩基程度である。

【0013】

上記のような核酸の3'又は5'末端にホモポリマーを結合する方法としては、公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、市販されている核酸

合成器を用いて、上記核酸の3'又は5'末端に核酸塩基が少なくとも3塩基以上重合するように、一体として合成する方法が挙げられる。また、ホモポリマーを、上記核酸と化学的若しくは酵素的な手法を用いて結合する方法等が挙げられる。ホモポリマーを構成する核酸塩基は、核酸がDNAである場合はアデニン、グアニン、シトシン又はチミンであり、RNAである場合はアデニン、グアニン、シトシン又はウラシルである。

【0014】

ホモポリマーの長さとしては、3塩基以上100塩基以下が好ましく、5塩基以上50塩基以下がより好ましく、10塩基以上40塩基以下が特に好ましい。この塩基数が2塩基以下であると、十分な量の核酸を担体上に固定できず、また、塩基数が101塩基以上であると核酸製造工程で著しく収率が低下する。

【0015】

また、ホモポリマーは、ある塩基から構成されるホモポリマーと、他の塩基から構成されるホモポリマーが連結したものであってもよい。

前記ホモポリマー中に、同ホモポリマーを構成する核酸塩基と異なる塩基を挿入しておくと、固相化核酸とハイブリダイズさせる試料核酸とのクロスハイブリダイゼーションを抑制することができる。例えば、ホモポリマーとしてポリT又はポリUを用いた場合、試料核酸中にポリARN Aが含まれていると、特異的領域の配列と無関係にハイブリダイズしてしまう。このような場合であっても、ポリT又はポリU中に他の塩基又は任意の核酸と塩基対を形成しない化合物を挿入しておくと、ハイブリダイゼーションが抑制される。このような化合物としては、例えば、アデニン誘導体、シトシン誘導体、チミン誘導体、グアニン誘導体、ウラシル誘導体、プリン環及びピリミジン環を有しないデオキシリボ核酸及びリボ核酸、グルコース、ガラクトース、マルトース、アルキル基含有化合物、アルコキシル基含有化合物、アミノ基含有化合物、イミノ基含有化合物、水酸基含有化合物、ハロゲン含有化合物、スルホン酸誘導体、カルボン酸誘導体、ホスホン酸誘導体等の公知の化合物を挙げることができる。また、挿入される塩基又は化合物の長さとしては、1~70程度である。

【0016】

<2>核酸固相化用基材

本発明において核酸を固相化するのに用いる基材は、物理的吸着又は化学結合によって核酸を固相化することができ、通常のハイブリダイゼーションの条件に耐えうるものであれば特に制限されない。具体的には、核酸の固定及びハイブリダイゼーション等に用いる溶剤に不溶であり、かつ常温若しくはその付近の温度範囲内（例えば0℃～100℃）で固体又はゲル状であるものが挙げられる。尚、基材が溶剤に不溶性であるとは、基材に後述のようにしてカルボジイミド基等の核酸に結合性を有する担体が胆持され、ついで核酸が固相化され、その後、例えば、DNAチップ等として使用される際の各過程で用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤に実質的に不溶性であることをいう。

【0017】

このような基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。

上記プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミド及びアクリル樹脂等が挙げられる。

【0018】

また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

また、金属として具体的には、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、パラマグネット及びアパタイト等が挙げられる。

【0019】

また、天然高分子としては、ポリアミノ酸、セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸及びそれら誘導体が挙げられる。

また、セラミックとして具体的には、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

【0020】

上記基材の形状としては、例えば、フィルム、平板、粒子、成形品（ビーズ、

ストリップ、マルチウェルプレートのウェルまたはストリップ、チューブ、メッシュ、連続発砲フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライド及び細胞培養容器等)、ラテックス等を挙げることができる。また、それらの大きさについては、特に制限は無い。

【0021】

上記基材に核酸を固相化するにあたって、基材に核酸を直接固定化してもよく、担体を基材に担持させて、担体を介して核酸を基材に固定化してもよい。担体としては、担体自体が核酸に結合性を有していてもよく、核酸に結合性を有するリガンドを介して核酸を固定化できるものであってもよい。ここで、「担持」とは、担体に核酸を固相化する際や、核酸固相化基材をDNAチップ等として使用する際等に用いられる水溶性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤中で、基材から上記担体が実質的に脱離しないことを意味する。

【0022】

本発明に用いられる担体は、上記基材上に担持される限り、単に物理的な接着性を利用して担持されていてもよく、また、化学的に共有結合等を介して胆持されていてもよい。また、上記担体は、必要に応じ、基材上の全面において担持されても、また、その一部において胆持されてもよい。

【0023】

担体としては、有機低分子、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。

上記有機低分子として具体的には、カルボジイミド基含有化合物、イソシアネート基含有化合物、窒素イペリット基含有化合物、アルデヒド基含有化合物、アミノ基含有化合物等が挙げられる。

【0024】

また、プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミド及びアクリル樹脂等が挙げられる。

【0025】

また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

また、金属として具体的には、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、パラマグネット及びアパタイト等が挙げられる。

【0026】

また、天然高分子としては、ポリアミノ酸、セルロース、キチン、キトサン及びそれらの誘導体が挙げられる。

また、セラミックとして具体的には、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

【0027】

このような担体は、上記基材に対して高い接着性を有するものであり、この接着性を利用して基材に担持されるものである。尚、前記担体が基材上に物理的な接着性を利用して担持される際の代表的な形態は皮膜である。前記基材上に前記担体を皮膜で担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコーティング等の公知の方法を用いることができる。

【0028】

例えば、ガラス基材の表面全体にカルボジイミド基を有する樹脂を担持させるには、まず、3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に、70～80℃程度の温度条件下でガラス基材を概ね2～3時間程度浸漬したあと、これを取り出して溶液を水洗し、さらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥する。乾燥後、適当な溶媒中に浸し、カルボジイミド樹脂を加え30～170℃程度の温度条件下で12時間程度攪拌し洗浄すれば良い。また、上記3-アミノプロピルトリエトキシシランのアミノ基と窒素イペリット基の核酸結合基以外の官能基を適当な溶媒を用いて反応させ、ガラス基材の表面に窒素イペリット基を導入することもできる。

【0029】

また、ガラス基材にアミノ基以外の官能基を存在する場合や、基材がガラス以

外の材料からなる場合においても、上記基材の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基を導入することは、従来より一般的に行われていることであり、その方法も公知であるので、このような公知の方法を用いて基材表面への官能基の導入を行うことができる。

【0030】

さらに、上記で挙げた基材のプラスチック基材の中には、基材表面に既に上記のような官能基を有するものも有り、この場合には基材表面に官能基を導入することなしに、これをそのまま担体の製造に用いることも可能である。また、このようなプラスチック基材であってもさらに官能基を導入して上記担体の製造に用いることも可能である。

【0031】

<3>核酸固相化基材及びその製造法

上記核酸を核酸固相化用基材上に固相化すると、本発明の核酸固相化基材が得られる。核酸を固相化するに際し、基材上に核酸を点状に固定することが好ましい。点状に固定するとは、基材の大きさに対して、核酸固定部位が複数個所設けられる程度に充分小さいことをいう。前記点の形状は、特に制限されず、核酸固相化基材の使用形態、用途等により適宜選択されうる。

【0032】

核酸固相化用基材に固相化される核酸としては、上記<1>で挙げた核酸が特に制限無く挙げられる。

また、上記本発明の核酸固定用基材において複数個所に点状に固相化されているそれぞれの核酸は同一であっても異なってもよく、異なる核酸を用いる場合の各核酸の配置等については、得られる核酸固定用基材の使用形態、用途等により適宜選択されうる。

【0033】

このような核酸を上記担体に点状に固定化するには、担体上に、適当な条件下で、微量の核酸を所望の大きさの点状に供給することで、担体と核酸を接触させ固定させればよい。

【0034】

具体的には、例えば、両者の接触反応において固定化される核酸の活性が維持されるように、通常、核酸は水またはバッファー中に含まれる形で供給される。また、接触の際の温度としては固定化される核酸の活性が失われないように、概ね0～100℃とすることが好ましい。

【0035】

また、両者の接触後にUV等の電磁波を照射することによって固定することもできる。さらに、核酸とカルボジイミド樹脂、窒素イペリット、ポリアミノ酸、二トロセルロール等の公知の化合物を化学的に結合又は物理的に結合した状態で、これら混合物と担体を接触させ固定させても良く、また、このときUV等の電磁波を照射して固定しても良い。

【0036】

本発明において微量の核酸を、通常は、核酸を含有する水またはバッファーを、担体に点状に供給する手段として、ディスペンサを用いる方法、ピンを用いる方法、バブルジェットを用いる方法等があるが、本発明がこれらに限定されるものではない。また、このように溶液を微量に供給する装置は、一般に市販されており、本発明においてもこれらを用いることが可能である。

【0037】

本発明の核酸固定用基材は、これを用いて分析等を行う際に、上記固定化核酸以外にの核酸等を接触させる機会が多いが、担体に担持された未反応核酸固定部分に上記固定化核酸以外の核酸等が非特異的に結合することを防ぐため、上記のようにして点状に核酸を担体に固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、サケ精子DNA等を担体に接触させ、未反応核酸固定部分をブロックしておくことが好ましい。

【0038】

このようにして得られる本発明の核酸固定化基材は、前記核酸が担体に非常に強固に担持されたものであり、ハイブリダイゼーション等で広く使用されている洗浄方法（界面活性剤を用いた洗浄方法）によっても脱離することができなく、これを用いて分析等を行った場合、再現性、定量性に優れた分析が可能となる。また、本発明の核酸固定用基材は、核酸が、鎖の数や長さに制限されずに固定され得

るので、同一基材上で種々の核酸を同時に取り扱うことができる。

【0039】

これらのことから、本発明の核酸固定用基材は、多数の核酸を用いてハイブリダイゼーション法により塩基配列を決定する技術、SBH (Sequencing By Hybridization) 法、SHOM (Sequencing by Hybridization with Oligonucleotide Matrix) 法等に用いられるDNAチップ等に、優れた性能を持って適用可能であるといえる。

【0040】

また、本発明の核酸固相化基材は、ハイブリダイゼーションによる核酸の回収にも好適に用いることができる。

【0041】

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明する。

【0042】

【製造例】カルボジイミド化スライドガラスの作製

(1) アミノ化スライドガラスの作成

蒸留水180mlに10% (v/v) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン/エタノール溶液20mlを加え攪拌した。そこに6N HClを加え、pH3~4に調整した後、スライドガラスを15枚浸漬し、75°Cにて2時間加熱処理した。加熱終了後、スライドガラスを溶液から引き上げ、蒸留水でよく洗い流した後、115°Cにて4時間加熱処理して、アミノ化スライドガラスを得た。

【0043】

(2) カルボジイミド樹脂の作製

ヘキサメチレンジイソシアナート(アルドリッヂ社製)117.9gにイソシアヌ酸シクロヘキシル(東京化成社製)12.5g及び3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド(アルドリッヂ社製)1.3gを加えた。次いで、窒素を流速0.5ml/分で加えながら、185°Cにて96時間攪拌した。冷却後、カルボジイミド樹脂を粉末として得た。得られた樹脂の平均重合度は10であり、数平均分子量は2400であった。

【0044】

(3) カルボジイミド化スライドガラスの作製

前記(2)で作製したカルボジイミド樹脂の10%クロロホルム溶液を作製し、これに(1)で作製したアミノ化スライドガラスを15枚浸漬し、直ちに引き上げた。次いで、クロロホルム200mlによる10分間の洗浄を2回行った後、40℃で2時間乾燥して、カルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0045】

【実施例1】

(1) 末端に重合した塩基を有する核酸の固定

配列番号1に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(31mer)を、100ng/μlになるように2MNAClに溶解し、DNA溶液とした。スポットタ(SPBIO:日立ソフトウェアエンジニアリング(株)社製)を用い、上記製造例で得たカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を500箇所にスポットした。これを乾燥機に入れ、37℃にて15分間乾燥した。次いで、3%BSA(ウシ血清アルブミン)を含む緩衝液A(0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸(pH7.5)、0.05%トライトンX-100)に浸し、37℃にて15分間乾燥した。次に、このスライドガラスをTE緩衝液(10mMトリス塩酸、pH7.2/1mM EDTA)で洗浄後、37℃にて15分間乾燥した。

【0046】

一方、コントロールとして、後述のプローブと全く相補性を示さないオリゴマー(配列番号3)も同様に、カルボジイミド化スライドガラスに固定化した。

【0047】

(2) ハイブリダイゼーション

上記のスライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション溶液[3×SSC(SSC:1.5MNACl、0.15Mクエン酸ナトリウム)、10%デキストラン、1pmolビオチン化プローブ]30μlをのせ、42℃のウォーターバスで1晩加熱した。尚、プローブ核酸には、シゲラ(Shigella)属細菌由来のシガ様毒素(Shiga-like toxin)タイプ2遺伝子を、ビオチン標識

したプローブを用いてPCRにより増幅し、得られた増幅産物（約1.2kb）を用いた。

【0048】

(3) ポストハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取り、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0049】

[ポストハイブリダイゼーション洗浄液及びその条件]

- (i) 2×SSC、1% SDS；室温、5分間、2回
- (ii) 0.2×SSC、1% SDS；40℃、5分間、2回
- (iii) 2×SSC；室温、5分間、1回

【0050】

(4) ハイブリダイゼーションの検出

3%BSAを含む緩衝液A 500mlに、上記ポストハイブリダイゼーション洗浄後のスライドガラスを浸漬し、室温で30分間ブロッキングを行った。次に、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート溶液（3%BSAを含む緩衝液Aで原液を2000倍に希釈したもの。ベーリングガーマイハイム社製）45mlに浸し、室温で30分間反応させた。次に、スライドガラスを緩衝液A 50mlに浸し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。次にスライドガラスを緩衝液B 30mlで1回洗浄した。最後に基質溶液（緩衝液B 20ml、BCIP（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルフェヌルフェート）溶液 $18\mu l$ 、NBT（ニトロブルーテトラゾリウム）溶液 $36\mu l$ ）に浸し、室温で3時間放置し、発色反応を行った。その結果を表1に示す。

【0051】

[緩衝液Aの組成]

O. 2M NaCl

O. 1M トリス塩酸（pH7.5）

0. 05% トライトンX-100

【緩衝液Bの組成】

0. 1M NaCl

0. 1M トリス塩酸 (pH9. 5)

【0052】

【比較例1】

実施例1の(1)～(4)において、配列番号1に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(31mer)の代わりに配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(21mer)を用いた以外は、実施例1と同様にしてハイブリダイゼーション及び発色反応を行った。その結果を表1に示す。

【0053】

【表1】

表1

シグナル検出

実施例1	◎
比較例1	○

◎：大部分のシグナルが非常に高感度かつ
非常に明瞭にあらわれた。

○：大部分のシグナルが高感度かつ明瞭に
あらわれた。

【0054】

表1の結果から、本発明の核酸の検出方法によれば、核酸の検出が非常に高感度かつ非常に明瞭なシグナルとしてあらわることがわかる。

一方、コントロールとして上記プローブと全く相補性を示さないオリゴマーも同様に固定化した。その場合は、実施例1及び比較例1のいずれにおいても、シグナルは、全く現れなかった。

【0055】

【発明の効果】

本発明により、安定に担体上に固定化できる核酸が提供される。任意の核酸の末端に重合した塩基を付加することにより、担体上に固定できる任意の核酸の量を増やすことができるため、検出感度を向上できる。

また、付加した塩基と担体が選択的に反応するため、ハイブリダイゼーションに必要な任意の核酸中の塩基を担体との固定に用いることなく核酸検出を行うことができる。これにより、塩基配列の違いをより選択的に検出できる核酸検出法を提供できる。

さらに、核酸が強固に担体に結合できるため、再現性、定量性に優れたDNAチップ等としての用途に有効な核酸固定化基材となり得る。

【0056】

【配列表】

<110> 日清紡績株式会社

<120> 固相化核酸及び核酸の検出法

<130> P-7095

<140>

<141> 2000-01-26

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0057】

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

ttttttttt gttacccaca taccacgaat c

31

【0058】

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

gttacccaca taccacgaat c

21

【0059】

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

ttttttttt ttcttctcag tgcgcaaatt

30

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基材上に核酸を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、及び同方法を用いてハイブリダイゼーションによる核酸の検出を高感度で行う方法、及びこの方法に用いる核酸及び核酸固定化基材を提供する。

【解決手段】 固相化核酸を用いたハイブリダイゼーションによる核酸の検出法において、3'又は5'末端の一方に、3塩基又はそれ以上の長さのホモポリマーが結合した核酸であって、基材上に固相化された核酸を固相化核酸として用いる。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000004374]

1. 変更年月日 1993年 3月30日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号
氏 名 日清紡績株式会社